



## 新奇遺伝子dia1、dia2の発現制御による、粘菌細胞の増殖/分化の調節

著者	廣瀬 滋規
号	1
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第8号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/62504">http://hdl.handle.net/10097/62504</a>

ひろ　せ　しげ　のり

氏 名（本 籍 地）　　廣　瀬　滋　規

学 位 の 種 類　　博士（生命科学）

学 位 記 番 号　　生博第8号

学 位 授 与 年 月 日　　平成16年3月25日

学 位 授 与 の 要 件　　学位規則第4条第1項該当

研 究 科 ， 専 攻　　東北大学大学院生命科学研究科

（博士課程）生命機能科学専攻

論 文 題 目　　新奇遺伝子 *dial*、*dia2* の発現制御による、粘菌細胞の増殖／  
分化の調節

博 士 論 文 審 査 委 員　　（主査）教 授 前 田 靖 男

教 授 山 本 和 生

教 授 水 野 健 作

## 論文内容の要旨

### 序論

多細胞生物の形態形成過程において細胞の増殖と分化は必要不可欠の役割を果たしている。個体内の各細胞は外的および内的環境からのシグナルに応答して分化を開始する。しかしながら、個々の細胞に注目すると、細胞は増殖か分化のどちらかの状態しかとることができず、増殖と分化は総じて背反的な関係にある。互いに相容れない増殖と分化は時間的、空間的に制御されることで生物は複雑な形態形成を成し遂げる。この機構がうまく働かない場合、個体発生の異常をもたらし最終的には致死となってしまう。また、増殖と分化の統御機構の異常は個体に甚大な悪影響を与え、例えば癌化やアルツハイマー病の素因となる。アルツハイマー病においては脳神経細胞の細胞周期制御の攪乱がアポトーシスを引き起こしさらには脳の縮小につながる(Nagy *et al.*, 1998)。このように増殖/分化の統御機構の解明は重要な研究課題であり、発生生物学のみならず医学的にも意義深い。

この種の研究を遂行するに際して、細胞性粘菌は非常に優れたモデル生物だといえる。粘菌細胞は外部の栄養条件に依存して生存戦略(増殖、分化)を変化させるため、細胞の増殖/分化の切り換えの観察が容易である。また、すぐれた細胞周期同調系が確立されているため(Maeda, 1986)、細胞周期の同調によって分化と増殖の関係を細胞周期調節の観点から調べる事が可能である。実際に、細胞周期上のG2後期には増殖/分化のチェックポイント(putative-shift point ; PS 点)が特定され、この特異点における分子的できごとを明らかにすることを手がかりに、粘菌細胞の増殖/分化統御機構を解析できるようになった。

PS 点の解析についてはタンパク質のリン酸化と遺伝子発現の制御に注目した研究が進められている。PS 点特異的に発現する遺伝子群は differential screening、differential display 法によって単離され、6 種類(*quit1*, *quit2*, *quit3*, *dia1*, *dia2*, *dia3*)がクローニングされている(Abe, 1993; Chae, 1997)。*quit1* は PS 点からの分化に伴って発現し、cAMP レセプター1 をコードする遺伝子 *car1* と同一である(Abe and Maeda, 1994)。*car1* 遺伝子の破壊は粘菌細胞の分化不全を引き起こし、*car1* 破壊株は集合すらできなくなることから cAR1 は初期分化の発現に必須である(Sun *et al.*, 1990; Sun and Devreotes, 1991)。粘菌細胞の集合には cAMP が走化性物質として機能しており、cAMP と結合した cAR1 は3量体 G タンパク質を介したシグナル伝達系を作動させる(Devereotes, 1994; Michael and Loomis, 1998)。cAR1 はまた、3量体 G タンパク質を介することなく細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を誘起する(Milne, *et al.*, 1995)。この様に cAR1 と cAMP との結合は数多くのシグナル伝達系を活性化し、分化、特に細胞集合プロセスに関わる遺伝子の発現を誘導して初期分化に中心的な役割を担っている(Soede *et al.*, 1994)。PS 点特異的遺伝子 *quit2* は新奇の  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質(CAF-1)をコードしており、*caf1* 遺伝子の過剰発現は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存的に初期分化を促進する(Itoh *et al.*, 1998)。また、*quit3* は *annexinVII* 遺伝子と相補的な DNA 配列を持ち、細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシスに関与するアネクシン VII の合成をアンチセンス RNA により制御する可能性が示唆されている(Okafuji *et al.*, 1997)。ミトコンドリアゲノムにコードされ、PS 点からの分化に伴って一過的に発現する遺伝子、*dia3* は 4 つの遺伝子

(NADH 脱水素酵素サブユニット 5 (*nad5*), 11 (*nad11*) およびリボソームタンパク質 S4 (*rps4*), S2 (*rps2*)) からなる遺伝子クラスターとして転写される。*rps4* 遺伝子を部分破壊してミトコンドリアをヘテロプラスミー (mitochondrial heteroplasmy) 状態にしてやると粘菌細胞の分化が著しく阻害され、逆に *rps4* を過剰発現すると早熟的な分化が誘導される。この *dia3* の発見は増殖/分化の切り換え機構の中でミトコンドリア、特に RPS4 が重要な役割を果たすことを示唆しており非常に興味深い。以上のように、PS 点特異的に発現する遺伝子は多岐にわたり、増殖/分化の切り換え機構には数多くの因子が複雑なネットワークを構成しながら関与していると考えられる。

## 要約

本研究においては PS 点の実体を明らかにするために 2 つのアプローチを試みた。一つは、従来どおりに PS 点特異的に発現するが、その機能については未知のままであった 2 つの遺伝子、*dia1*, *dia2* の機能解析を通して PS 点における役割を解明することを目的とした。もう一つは、これまで解析が行われていなかった PS 点における遺伝子の転写調節機構を明らかにするために、*dia1* 遺伝子のプロモーター解析をした。また、この過程で粘菌細胞の増殖/分化の切り換えを可視化するための優れたマーカーシステムを構築できたので、それについても述べる。

### 第 1 部 *dia1* の機能解析

*dia1* (differentiation-associated gene 1) は新奇遺伝子で推定分子量約 48 kDa のタンパク質 (DIA1) をコードしている。DIA1 の主な特徴としては C 末端領域に非常に多くのセリン残基を持つことが挙げられ、その一次構造から GPI アンカーを介して細胞膜に局在していることが予測される。*dia1* に関する形質転換体の作製とその解析から、*dia1* の過剰発現は分化の開始を遅らせ、細胞集合過程での cAMP シグナル伝達に関わる遺伝子群の発現を抑制することが示された。これに関連して、cAMP のシグナル伝達系は *dia1* の発現および DIA1 タンパク質の機能を抑制することが示された。これらの結果から、*dia1* の発現 (DIA1) は PS 点からの分化の進行にブレーキをかけ、飢餓処理時点の細胞周期の差に応じて生ずる細胞間での分化段階の不揃いがある程度そろえ、すべての細胞を形態形成に参加させる役割を担っているのではないかと推測される。

### 第 2 部 *dia2* 遺伝子の機能解析

PS 点特異的な発現を示すもう一つの遺伝子、*dia2* は推定分子量 16.9kDa のタンパク質 (DIA2) をコードする新奇遺伝子である。*dia2* の発現をアンチセンス RNA の発現によって抑制した株 (*dia2*<sup>AS</sup> 細胞) では細胞集合に顕著な異常が観察される。しかしながら、この発生異常は少数の野生株の存在によって解除されることが分かり、これには野生株から分泌される cAMP が関与していることが示唆された。今回、粘菌細胞への

cAMP パルス投与は飢餓処理後の *dia2* の発現を誘導できることも確認され、DIA2 タンパク質が粘菌細胞の集合期における cAMP シグナル伝達系において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。また、DIA2-GFP 融合タンパク質は細胞内において小胞体に局在していることが判明し、この DIA2 の小胞体局在はまた、DIA2 に対する特異抗体を用いたウェスタンブロッティングによっても確認された。

### 第3部 *dia1* プロモーター領域の解析

*dia1* 遺伝子のプロモーターは興味深い特徴をもち、*fkbp2* 遺伝子と対をなしながらプロモーター領域を共有することが分かった。*fkbp2* は増殖期において特異的に発現し、細胞周期同調系を用いたより詳細な発現解析によると、*fkbp2* の発現は飢餓に特異的に応答して抑制されることが示された。*fkbp2* の発現制御様式は、PS 点での飢餓に伴って特異的に発現増大をする *dia1* とは対照的で、両者のプロモーター領域は増殖/分化の切り換え時において逆相関でもって ON/OFF されることが明らかとなった。EMSA (electrophoretic mobility shift assay) とプロモーターデリーションによる解析の結果、増殖期と分化期においてこの *dia1/fkbp2* プロモーター領域には異なる DNA 結合タンパク質が結合することが明らかにされ、その標的配列は AAAGTATTAGCTCGATCCCCT であった。この配列は、面白いことに、DNA 結合タンパク質である Myb の標的配列を含んでいる。なお、プロモーターのデリーション解析によって、この領域は増殖期において *fkbp2* 遺伝子の発現を活性化する機能をもっている事が明らかとなった。*dia1/fkbp2* プロモーターのユニークな特徴を利用したマーキングシステム“suika”の確立によって粘菌細胞の増殖から分化への状態変化を可視化することに成功した。さらに、この“suika”システムを種々の発生異常を示す形質転換体に導入した結果、このマーカーは粘菌細胞における増殖/分化の切り換えプロセスと初期分化のプロセスを明瞭に区別することを可能にした。そして、アデニル酸シクラーゼ (ACA)、3量体 G タンパク質βサブユニット (Gβ) は増殖/分化の切り換えプロセスに、cAMP レセプター-1 (cAR1) は初期分化プロセスに関与することが示された。

### まとめ

本研究で解析した *dia1* および *dia2* は、PS 点から分化を開始した際に特異的に発現する遺伝子として単離されたもので、分化の開始にあたって重要な位置を占める遺伝子である。DIA1 と cAMP シグナル伝達系は粘菌の初期分化期に負のフィードバック関係にすることが示された。この発見は PS 点特異的に発現する遺伝子の多くが分化に促進的であることとは対照的であり、PS 点での分子機構に新たな視点を与えられた。一方で、*dia2* 遺伝子は cAMP シグナル伝達系に促進的に係わっており、その遺伝子産物、DIA2 は小胞体に局在して cAMP の分泌に関わる可能性を示した。

*dia1* のプロモーターの機能解析は思いもよらない結果をもたらしてくれた。今回、細胞の状態(増殖および分化)によって異なる DNA 結合タンパク質が *fkbp2/dia1* プロモーター内にある反復配列 (AAAGTATTAGCTCGATCCCCT) と相互作用して、増殖/分化の切り換え時の *fkbp2* から *dia1* への発現

の切り換えにはたらくことが示された。加えて、プロモーターデリーション解析によって両遺伝子の発現に必須の領域も特定できた。また、*dial1/fkbp2* プロモーターの特性を利用した増殖分化統御のマーカー“suika”の作製により、これまで困難を伴った粘菌細胞の増殖/分化の切り換えプロセスと初期分化プロセスの分離に成功し、これを用いたアッセイにより、増殖/分化の切り換えプロセスに係る遺伝子と初期分化プロセスに係る遺伝子を特定できたことは意義深いといえる。

今後、DIA1 および DIA2 とその他の PS 点に関与するタンパク質との関係を調べることで、PS 点近傍での分子ネットワークを明らかにし、それらの機能解析を通じて行けば増殖/分化の切り換えにおけるメカニズムに肉薄できることを期待する。

## 論文審査結果の要旨

発生・細胞研究のモデル生物として注目されている細胞性粘菌では、きわめて優れた同調培養系が既に確立されており、増殖から分化へのチェックポイントが細胞周期上に1つの特異点 (PS 点) として特定されている。したがって、この生物は、増殖と分化との関係、とりわけ増殖/分化の切り換え(growth/differentiation transition; GDT)の分子機構を解析する上で格好の実験系になっている。PS 点からの分化に伴って特異的に発現する6つの遺伝子のうち、申請者は、特に *dial* 遺伝子について機能解析を進め、以下に示すような顕著な研究成果を得た。

*dial* 遺伝子は、PS 点での飢餓、すなわち分化開始に伴って特異的に発現するものであるが、その過剰発現は分化の進行をむしろ抑制し、ホモログス・リコンビネーションによる遺伝子破壊は分化に促進的にはたらくことが明らかにされた。*dial* は、面白いことに、別の遺伝子(*fkbp2*)とプロモーター領域を共有しており、この共通プロモーター領域は双方向性をもち、*fkbp2* 遺伝子は飢餓に伴ってその発現を停止し、逆に *dial* 遺伝子は飢餓(分化)に際して発現を開始することが示された。また、このプロモーター領域のきわめて短い領域(約 140bp)が両遺伝子の主要な活性調節部位であること、そして、増殖期と分化期では相異なる転写調節因子がこのプロモーター領域に結合していることを明らかにした。さらに、増殖/分化の切り換え(GDT)を可視化する目的で、共通プロモーター領域の *fkbp2* 側に *GFP* 遺伝子を、*dial* 側に *DS-red* 遺伝子を繋ぎ、このベクター(“suika”ベクターと命名)を粘菌細胞に導入したところ、得られた形質転換体は、蛍光顕微鏡下において、増殖期においては緑色を、分化期では赤色を呈することが実際に確認された。さらに、この“suika”ベクターを種々の集合不能変異種に導入して解析した結果、アデニル酸シクラーゼ(ACA)とGタンパク質βサブユニット(Gβ)はまさに GDT のプロセスで、また cAMP レセプター 1 (CAR1)は GDT 以降の初期分化のプロセスで機能していることが示された。これらの事実はまた、REMI(制限酵素介在型遺伝子挿入)法によってランダム変異を導入した細胞に“suika”ベクターを導入すれば、種々の GDT あるいは分化不能変異種を FACS(cell sorter)により効率的に峻別・採取できる可能性を示唆した。

これらの成果は、いずれも学問的に高く評価されるものであり、将来的にも GDT の分子的メカニズムを解明する上できわめて有望なシステムを提供するものである。これらは、申請者の高い学問的素養、すぐれた実験技術と実行力に支えられてはじめて達成できたものと判断する。このことは、本人が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、広瀬滋規提出の論文は、博士(生命科学)の学位論文として合格と認める。